

1 Introdução

1.1.Câncer

O câncer é definido como um tumor maligno, o qual é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células anormais levando a invasão de órgãos e tecidos adjacentes. A disseminação dessas células para outras regiões do corpo dá origem a tumores em outros locais, caracterizando o processo chamado de metástase¹.

O tratamento do câncer é feito por meio de um ou vários procedimentos combinados. O principal procedimento é a cirurgia, que pode ser empregada em conjunto com radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. O tratamento mais adequado é escolhido de acordo com a localização, o tipo do câncer e a extensão da doença².

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, por meio de feixe de radiações ionizantes. Nesse caso, uma dose pré-calculada de radiação é aplicada em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, com o objetivo de erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada. As radiações ionizantes de alta energia interagem com os tecidos originando efeitos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA. A morte celular então pode ocorrer por vários mecanismos, que vão desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução. Estima-se que cerca de 60% de todos os pacientes portadores de doenças malignas são orientados a fazer a radioterapia durante o curso de sua doença, seja com o objetivo curativo ou paliativo³.

A quimioterapia, o qual utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos é outro tratamento utilizado ao combate de doenças causadas por agentes carcinógenos. O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este gás foi observado que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. Em 1946, a partir de estudos clínicos feitos

com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemias, foi observado um avanço crescente da quimioterapia antineoplásica. Nos dias atuais, quimioterápicos mais ativos e menos tóxicos estão disponíveis para uso na prática clínica. Os avanços verificados na área da quimioterapia antineoplásica nas últimas décadas têm facilitado consideravelmente a aplicação de outros tipos de tratamento de câncer, permitindo maior número de curas². O objetivo da quimioterapia é destruir as células cancerosas, mas esse tratamento também afeta as células normais provocando efeitos colaterais como náusea, vômitos, perda de apetite, febre, queda de cabelo, feridas na boca, fraqueza, cansaço ou fadiga, inflamação nas veias (flebite) e sangramento¹.

O transplante de medula óssea é um procedimento médico da área da hematologia e oncologia que envolve o transplante de células-tronco hematopoiéticas provenientes da medula óssea de um doador. No receptor essas células migram pelo sangue até se fixarem na medula óssea do receptor e voltarem a se multiplicar e cumprir suas funções fisiológicas no paciente. O transplante pode ser de dois tipos: autogênico ou alogênico. O autogênico é quando a medula vem do próprio paciente. Enquanto no transplante alogênico a medula vem de um doador. O transplante também pode ser feito a partir de células precursoras de medula óssea, obtidas do sangue circulante de um doador ou do sangue de cordão umbilical¹.

Embora grandes avanços sejam feitos no tratamento e no controle da progressão do câncer, muitas deficiências permanecem.

1.2. Medicamentos falsificados

A falsificação e a fraude de medicamentos são problemas mundiais. No Brasil, entre 1997 e 1998, o Ministério da Saúde chegou a registrar 172 casos de falsificação, provocando questionamentos na sociedade sobre a qualidade e a segurança dos produtos comercializados nacionalmente. Várias medidas foram adotadas pelo governo a partir dessa crise, destacando a modificação da lei que tornou a falsificação um crime hediondo e a aprovação da Política Nacional de Medicamentos, que garante à população o acesso a medicamentos seguros e eficazes, e ações reforçadas com a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1999. No entanto, o problema da falsificação de medicamentos permanece⁴. Segundo a ANVISA, no ano passado (2009) o Brasil registrou um recorde de apreensão de remédios falsificados. Somente nos três

primeiros meses do ano a ANVISA e a Polícia Federal recolheram mais de 170 toneladas desses medicamentos. Em 2008 o número totalizou 20 toneladas. Dois fatores contribuíram para este cenário: o crescimento da ação de quadrilhas e o reforço na fiscalização, principalmente na fronteira, contra laboratórios ilegais⁵.

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que cerca de 10% dos medicamentos no mercado global são falsificados. No entanto, estima-se que essa proporção seja maior (aproximadamente de 25%) nos países em desenvolvimento, visto que não dispõem de regulamentação ou infraestrutura de fiscalização adequadas para o setor de medicamentos⁶. No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Ética Concorrencial (ETCO), cerca de 30% dos medicamentos consumidos no país estão dentro de algum tipo de informalidade como falsificação, contrabando ou sonegação de impostos⁷.

Existe uma grande variedade de falsificações de medicamentos, as quais podem ser divididas em seis classes: (i) produtos sem os ingredientes ativos; (ii) produtos com os ingredientes errados; (iii) produtos com quantidades incorretas dos ingredientes ativos; (iv) produtos com quantidades corretas dos ingredientes ativos, mas com fraude na embalagem; (v) cópias de um produto original; (vi) produtos com altos níveis de impurezas e contaminação⁸. Qualquer tipo de medicamento seja ele de marca reconhecida, genérico ou vendido sem receita médica pode ser alvo de falsificação.

Os fatores que possibilitam a falsificação de medicamentos são a falta de uma legislação e aplicação de leis inadequadas, falta de cooperação entre as partes interessadas (autoridades regulatórias responsáveis pelo cumprimento da lei, polícia, alfândegas e o poder judicial), elevado preço de medicamentos, falta de vontade política, visto que em alguns países as autoridades não estão preparadas para reconhecer o problema da falsificação de medicamentos e/ou para punir os falsificadores e a expansão e desregulação do comércio.

O uso de medicamentos falsificados ou de baixa qualidade pode afetar o tratamento de pacientes, que poderiam não receber a quantidade necessária de princípio ativo, essencial para o tratamento da doença. Uma situação ainda mais grave é a de produtos adulterados ou deliberadamente formulados utilizando substâncias tóxicas, que não podem ser usadas na fabricação de medicamentos, podendo ocasionar danos ainda mais sérios e até a morte⁸.

1.3. Camptotecina e seus derivados

Os alcalóides são substâncias isoladas de plantas de vários gêneros caracterizados por apresentar um nitrogênio heterocíclico⁹. No seu meio de origem, os alcalóides existem na forma de sais de ácidos orgânicos, tais como ácido láctico, málico, tartárico ou cítrico. Apesar do grande número de substâncias sintéticas, os alcalóides naturais ainda representam um dos mais potentes grupos de substâncias para o tratamento de muitas doenças. Tais substâncias constituem uma das mais importantes classes de fármacos antitumorais, sendo que os mais estudados devido a sua atividade citotóxica, são os compostos de três gêneros: Vinca (*Catharantus*), *Taxus* e *Camptotheca*¹⁰.

A camptotecina (CPT) é um alcalóide extraído da casca, dos frutos e das folhas da *Camptotheca acuminata*, uma planta que cresce em áreas relativamente quentes do sudoeste chinês, e que é tradicionalmente empregada na medicina chinesa na forma de chá⁹. Estruturalmente, as camptotecinas são caracterizadas por apresentar um anel pentacíclico apresentando uma porção α -hidroxi-lactona. Este composto apresenta-se como um pó amarelo, opaco e cristalino, de elevado ponto de fusão (264-267°C) e possui massa molar igual a 348,11 g mol⁻¹, correspondente a fórmula C₂₀H₁₆N₂O₄. É importante ressaltar que, das duas formas enantioméricas da camptotecina, 20-(S) e 20-(R), apenas a forma 20-(S) apresenta atividade antitumoral e produz uma intensa fluorescência sob luz ultravioleta (UV)¹⁰. Entretanto, a camptotecina é uma substância altamente hidrofóbica que inviabiliza a sua administração pela via intravenosa.

A CPT foi isolada durante o período de 1950-1959, por ocasião de um metucioso estudo que objetivava a obtenção de esteróides a partir da hidrocortisona. Após o isolamento e a elucidação estrutural da CPT e de seus análogos 10-hidroxi e 10-metoxi-camptotecina foi demonstrado que estes fármacos inibiam a síntese de DNA e RNA⁹. Os primeiros estudos clínicos realizados com a camptotecina foram conduzidos com o seu sal sódico, uma vez que a baixa solubilidade deste fármaco limitava a sua utilização pela via intravenosa. Embora a atividade antitumoral tenha sido observada em pacientes com câncer gastrointestinal, a verificação da toxicidade medular e outras não hematológicas foram consideradas agressivas para prosseguir com outros testes. Os efeitos colaterais observados incluíram mielossupressão, toxicidade gastrointestinal, cistite hemorrágica e alopecia. A mielossupressão, principalmente caracterizada pela leucopenia e trombocitopenia, foi o efeito dose-limitante^{11,12,13}.

Além disso, este fármaco apresenta uma elevada instabilidade em pH fisiológico, decorrente da abertura do anel lactônico e formação de sua forma carboxilada, menos ativa. Estudos posteriores evidenciaram que a manutenção do anel lactônico da camptotecina era crucial para a atividade antitumoral¹⁰.

Na década de 80, o interesse sobre o fármaco camptotecina foi retomado com a descoberta do mecanismo único para um alcalóide, envolvendo a inibição da Topoisomerase I (Topo I), enzima presente em altas concentrações nos tumores¹⁴. O mecanismo de ação, como mostrado na Figura 2, consiste na ligação da camptotecina covalentemente a Topoisomerase I formando um complexo ternário entre a CPT, Topo I e o DNA. A interação entre CPT e Topo I ocorre pelo ataque de um sítio nucleofílico sobre a enzima, na posição acila do anel E do fármaco. Como resultado ocorre o rompimento da dupla fita e do processo de transcrição do RNA¹⁵.

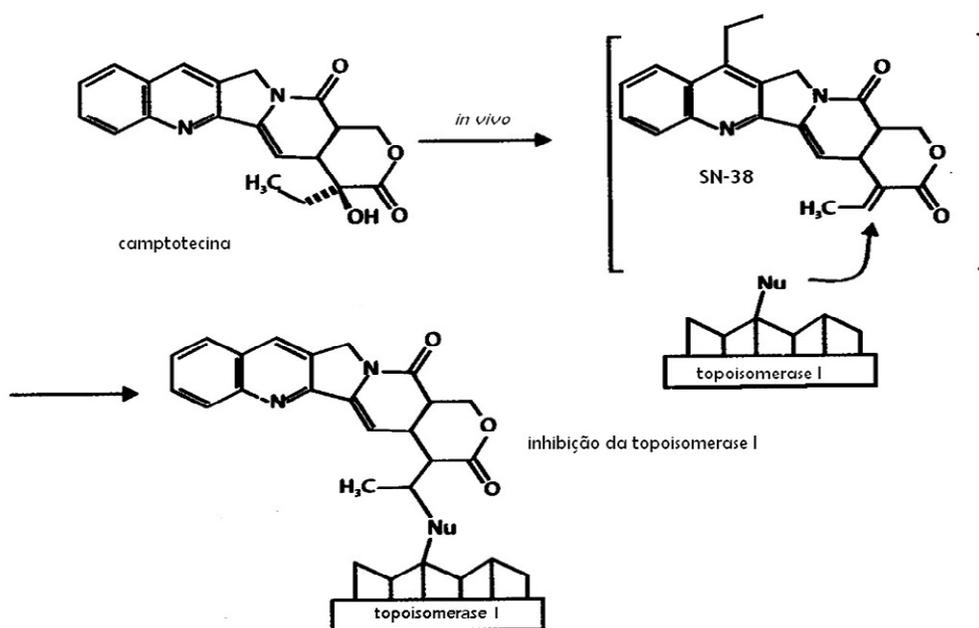
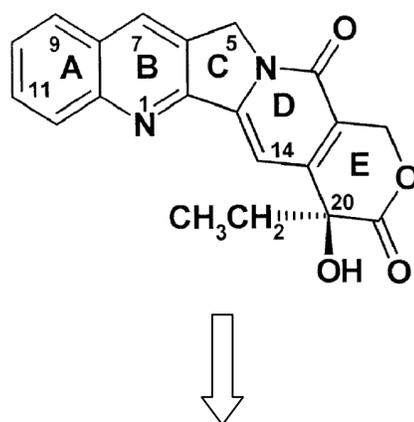


Figura 1: Mecanismo de ação da camptotecina.

Devido à grande importância da CPT no tratamento do câncer, vários análogos foram sintetizados na tentativa de manter as características essenciais da molécula para a citotoxicidade e produzir derivados solúveis em condições fisiológicas. Dois derivados da CPT, a irinotecana (CPT-11) e a topotecana

(TPT) foram aprovados pela *United States Food and Drug Administration* (US FDA) como medicamentos anticancerígenos. A TPT foi aprovada para o tratamento de câncer do pulmão e do ovário, os quais apresentam resistência aos outros medicamentos quimioterápicos¹⁶, enquanto que a injeção da CPT-11 foi aprovada para o tratamento de câncer do colo e do reto¹⁷.

A Figura 3 mostra as estruturas químicas da CPT, da CPT-11 e da TPT. Modificações no carbono 7, 9 e 10 da CPT formam derivados mais solúveis em água e menos tóxicos, permitindo o seu uso para o tratamento do câncer.



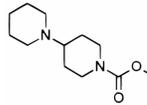
| SUBSTÂNCIA | C5 | C7 | C9 | C10 | C20(S) |
|------------|----|-------------------------------|---|--|--------|
| CPT | H | H | H | H | OH |
| TPT | H | H | (CH ₃) ₂ NHCH ₂ | OH | OH |
| CPT-11 | H | C ₂ H ₅ | H |  | OH |

Figura 2: Estrutura química da camptotecina, da irinotecana e da topotecana.

1.4. Métodos utilizados na determinação de CPT, CPT-11 e TPT

A maioria dos métodos descritos na literatura para a determinação da CPT, CPT-11 e da TPT empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção da fluorescência natural dessas substâncias. Além da detecção por fluorescência, outras formas de detecção como espectrometria de massa (MS) ou espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta/visível (UV/VIS) vem sendo utilizadas. Na Tabela 1 algumas informações sobre os métodos analíticos baseados no uso do HPLC são apresentadas. Em trabalhos mais recentes, técnicas baseadas na separação eletroforética em capilar com uso de meio micelar (MEKC) e por espectrofluorimetria foram desenvolvidos por Marques¹⁸, onde os limites de quantificação encontram-se na ordem de ng mL^{-1} , sendo $3,0 \times 10^1 \text{ ng mL}^{-1}$ e $2,6 \text{ ng mL}^{-1}$, para as técnicas eletroforética e espectrofluorimétrica, respectivamente. Para a determinação de CPT-11 foram desenvolvidos dois trabalhos baseados na técnica espectrofluorimétrica por Cáceres^{19,20}, onde os limites de quantificação encontrados foram de $4,2 \times 10^1$ e $2,5 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$.

A quantificação da CPT no medicamento e em fluidos biológicos deve ser rigorosa por se tratar de uma substância de elevada toxicidade. Medicamentos contaminados com CPT podem produzir efeitos indesejáveis, não curar e até causar a morte. Desta forma, é de grande interesse o desenvolvimento de métodos analíticos seletivos, sensíveis e simples. A fosforimetria em temperatura ambiente e em substrato sólido é uma técnica alternativa as já utilizadas e apresenta grandes vantagens, como a fácil operacionalidade, baixo custo e capacidade de determinação seletiva de substâncias muito semelhantes, sem necessidade de separação prévia do analito dos outros componentes da amostra analisada.

Tabela 1: Métodos analíticos por HPLC para a determinação de camptotecina e seus derivados

| Substância | Matriz | Coluna | Deteção / Comprimento de onda | LQ (ng mL ⁻¹) | Ref. |
|------------|---|---------------|---------------------------------------|---------------------------|------|
| CPT | Amostra de <i>C. acuminata</i> | RP-C18 | ESI-MS/MS | 15 | 21 |
| CPT | Sangue de rato, cérebro | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (360 / 440 nm) | 1 | 22 |
| CPT | Bilis de rato | Micro RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (360 / 440 nm) | 1 | 23 |
| CPT | Ratos, plasma, coração, fígado, baço, pulmão, rins, cérebro | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (360 / 430 nm) | 0,5 | 24 |
| CPT | Plasma humano | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (360 / 440 nm) | 0,19 | 25 |
| CPT | Plasma de cão | Zorbax SB-C18 | Fluorescência, Ex / Em (368 / 515 nm) | 1 | 26 |
| CPT-11 | Fígado e plasma humano | Alltima C18 | LC-MS/MS | 1,56 | 27 |
| CPT-11 | Soro humano | RP-C18 | LC-ES/MS | 10 | 28 |
| CPT-11 | Soro de rato | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (373 / 428 nm) | 5 | 29 |
| CPT-11 | Células de rato | ODS-C18 | Fluorescência, Ex / Em (380 / 540 nm) | 5 | 30 |
| CPT-11 | Plasma de rato | Hypersil C18 | Fluorescência, Ex / Em (380 / 540 nm) | 0,68 | 31 |
| CPT-11 | Plasma e urina humano | RP-C18 | LC-APCI/MS | * | 32 |
| CPT-11 | Plasma humano | TSK ODS-80Ts | Fluorescência, Ex / Em (380 / 556 nm) | 30 | 33 |

* não informado

Tabela 1 (continuação): Métodos analíticos por HPLC para a determinação de camptotecina e seus derivados

| Substância | Matriz | Coluna | Deteção / Comprimento de onda | LQ (ng mL ⁻¹) | Ref. |
|------------|------------------------------|----------------|---------------------------------------|---------------------------|------|
| CPT-11 | Plasma humano | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (355 / 515 nm) | 2 | 34 |
| CPT-11 | Plasma humano | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (362 / 425 nm) | 4,8 | 35 |
| CPT-11 | Plasma de rato e bilis | RP-C18 | DAD (365 nm) | 40 | 36 |
| CPT-11 | Plasma, urina e fezes humano | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (228 / 450 nm) | 1,0 | 37 |
| TPT | Plasma humano | Nova Pack C18 | Fluorescência, Ex / Em (380 / 527 nm) | 0,05 | 38 |
| TPT | Plasma humano | Agilent SB-C18 | Fluorescência, Ex / Em (376 / 530 nm) | 0,25 | 39 |
| TPT | Plasma de rato | Nova Pack C18 | Fluorescência, Ex / Em (361 / 527 nm) | 1,0 | 40 |
| TPT | Sangue humano | ODS 80A | Fluorescência, Ex / Em (381 / 525 nm) | 0,20 | 41 |
| TPT | Plasma, urina e fezes humano | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (380 / 527 nm) | 0,1 | 42 |
| TPT | Plasma e urina humano | RP-C18 | Fluorescência, Ex / Em (381 / 525 nm) | 10 | 43 |
| TPT | Plasma humano | Zorbax SB-C18 | Fluorescência, Ex / Em (361 / 527 nm) | 0,05 | 44 |
| TPT | Plasma humano | CTO-6A | Fluorescência, Ex / Em (390 / 520 nm) | 2 | 45 |

1.5. Fosforescência na temperatura ambiente

A luminescência é definida como a radiação emitida por espécies químicas (luminóforos) quando elas sofrem uma transição radiativa de um nível de energia excitado para outro nível de menor energia, o que é decorrente da interação entre a matéria com a radiação eletromagnética na região do visível e do ultravioleta (UV). A luminescência estimulada pela absorção de radiação é denominada fotoluminescência, a qual se divide em fluorescência e em fosforescência⁴⁶.

As moléculas no estado excitado têm um tempo de vida finito, visto que este estado não é energeticamente o mais estável. Assim, um conjunto de moléculas que se encontra excitado tende a retornar ao estado fundamental com a subsequente liberação da energia que foi anteriormente adquirida com a absorção do fóton. A liberação de energia pode ocorrer na forma de calor ou como emissão de radiação eletromagnética. No caso de emissão de radiação, esta será chamada fluorescência quando houver conservação do spin eletrônico, e fosforescência quando o spin do elétron for alterado durante o tempo que a molécula permanece no estado excitado. Na Figura 4, um esquema eletrônico é mostrado onde se pode ver o estado fundamental singlete (S_0), e as duas configurações citadas para o estado excitado, que são denominados singlete (S_1) e tripleto (T_1)⁴⁷.

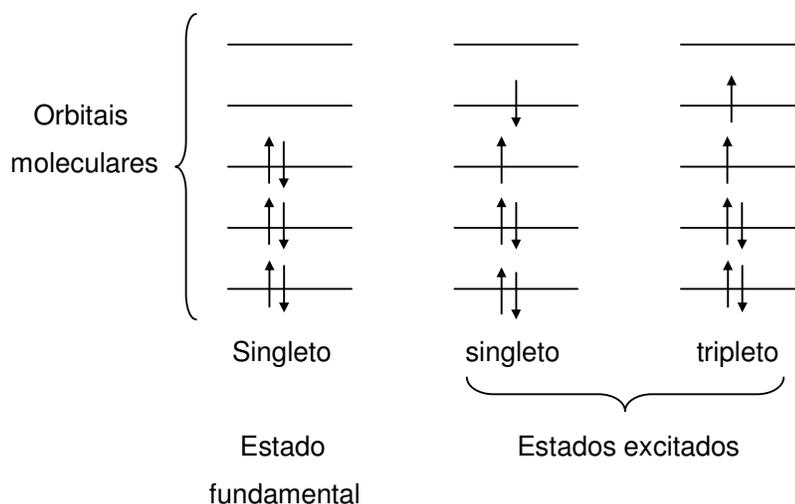


Figura 3: Esquema eletrônico para o estado fundamental e para as duas configurações do estado excitado de menor energia.

O diagrama modificado de Jablonskii (Figura 5) ilustra o mecanismo de promoção energética de uma população de moléculas após a absorção de energia radiativa até o retorno dessa população ao estado fundamental. Quando uma população de moléculas absorve fótons de energia apropriada, esta passa do seu estado fundamental (S_0) para o estado excitado de maior energia (S_n). A partir deste estado, a molécula pode sofrer um processo de desativação não-radiativa de energia, chamados: relaxamento vibracional (RV) e cruzamento interno (CI) passando para o estado excitado de menor energia vibracional (S_1). O relaxamento vibracional se caracteriza por perda de energia na forma de calor por meio de vibrações moleculares e/ou colisões com outras espécies do sistema, enquanto o cruzamento interno é transição não-radiativa entre estados eletrônicos de energia de mesma multiplicidade e que ocorrem por meio de níveis vibracionais degenerados. A partir de S_1 a molécula pode se desativar radiativamente por meio de dois processos. No primeiro, a população sofre transição de S_1 para S_0 com conseqüente emissão de radiação eletromagnética com uma freqüência menor que a da radiação absorvida. Essa desativação recebe o nome de fluorescência. No segundo processo, ocorre a troca de multiplicidade da população de moléculas do estado singleto (S_1) para o estado excitado tripleto (T_n) no processo denominado cruzamento intersistemas (CIS). Embora a transição entre estados excitados de diferentes multiplicidades seja quântomecanicamente proibida, o CIS pode ocorrer em casos onde existe acoplamento spin-orbital⁴⁸. A população de molécula tendo alcançado o nível vibracional de menor energia (T_1) por meio de CI e de RV, poderá alcançar S_0 (T_1 - S_0), recebendo o nome de fosforescência que é à base da técnica analítica conhecida por fosforimetria⁴⁹. Ambos os processos fluorescência e fosforescência sofrem competição direta dos processos não-radiativos, devido aos baixos tempos de vida do CI e do RV (da ordem de 10^{-13} e 10^{-14} s). A fosforescência, que possui um tempo de vida elevado (10^{-4} a 10^{-1} s) também compete com a fluorescência, a qual possui um tempo de vida na ordem de 10^{-7} a 10^{-9} s⁵⁰.

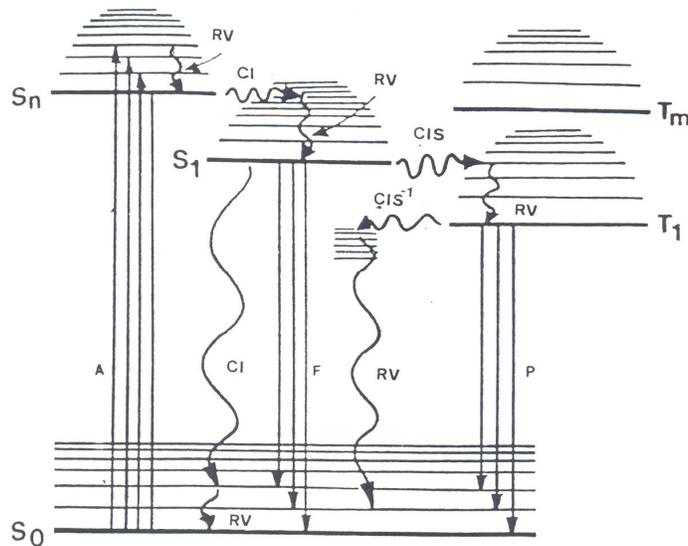


Figura 4: Diagrama modificado de Jablonskii.

1.5.1. Fosforimetria em temperatura ambiente e em substrato sólido (SSRTP)

Em 1960 a maioria das aplicações em fosforimetria usava matrizes em baixas temperaturas (77 K) para o enrijecimento do luminóforo. A rigidez do cristal formado minimiza a mobilidade das moléculas do analito e, por conseguinte, a desativação colisional, inibindo os processos não-radiativos e tornando-se viável a medição de fosforescência⁴⁸. A fosforimetria a 77K apresentava sérias desvantagens do ponto de vista experimental, visto que a precisão das análises depende, em parte, da homogeneidade e transparência do cristal formado pela solução do analito. Cristais rachados ou opacos aumentam o espalhamento da radiação de excitação e de emissão, deteriorando, conseqüentemente, a precisão das medições. Além de possuir custo elevado e exigir grande tempo para análise.

A fosforimetria em temperatura ambiente suportada em substrato sólido (SSRTP) surgiu como uma alternativa viável para o uso rotineiro da fosforescência como uma técnica analítica extremamente simples e de baixo custo. Limites de detecção absolutos da ordem de pg podem ser alcançados dependendo do analito, da superfície sólida e das condições experimentais. No substrato sólido, a imobilização do analito ocorre por meio de dois mecanismos: (i) interação (ligações de hidrogênio) entre os grupos hidroxila da celulose com os elétrons π ou outros grupos eletronegativos da molécula do analito e (ii)

encapsulamento físico das moléculas do analito nos poros do substrato sólido. Esses dois mecanismos dão a rigidez necessária para permitir o aumento da eficiência quântica fosforescente dos analitos de várias classes químicas. Substratos sólidos são compatíveis com o uso de diferentes tipos de sais de átomos pesados indutores de fosforescência, o que permite uma grande versatilidade do ponto de vista da amplificação de fosforescência e da busca de seletividade.

Roth em 1967⁵¹ foi o primeiro a comunicar a observação de fosforescência de compostos orgânicos adsorvidos em substratos sólidos. No entanto, o potencial da SSRTP somente foi reconhecido com os trabalhos de Schulman e Wallingem 1972 e 1973^{52,53}. Desde então, muitos trabalhos têm sido feitos na tentativa de tornar a SSRTP uma técnica competitiva para a análise ultratráço. A obtenção de limites de detecção e curvas analíticas comparáveis aos alcançados à 77K foi um fator extremamente atrativo do ponto de vista analítico⁵⁴.

Ainda hoje, trabalhos baseados na SSRTP vêm sendo desenvolvidos. Como exemplos de estudos realizados, vale ressaltar os trabalhos do LEEA-PUC-RIO, como o de Cunha⁵⁵ para a determinação seletiva de criseno e de pireno mostrando o potencial da técnica na determinação de outros 7 HPA, o trabalho de Souza⁵⁶ que determinou enrofloxacino em formulações farmacêuticas, a determinação seletiva de ciprofloxacina e norfloxacina em misturas contendo outras fluoroquinolonas por Nava⁵⁷, o desenvolvimento de um método para a determinação seletiva de harmane e harmine em amostras contendo esses dois derivados da β -carbolina por Marques¹⁸, a determinação de 2 metil indol e 7 metil indol por Mello⁶⁸, a determinação seletiva de compostos policíclicos aromáticos nitrogenados e sulfurados em gasolina e em sedimento por Cardoso⁵⁸.

Diversos materiais são usados como substratos sólidos, incluindo, celulose (papel cromatográfico ou de filtro), açúcares, acetato de sódio, sílica gel, ciclodextrinas, amido, alumina, ácido poliacrílico, etc. O papel de filtro ou cromatográfico vem sendo utilizado, sendo suas principais vantagens em relação aos outros materiais a fácil obtenção, o baixo custo, o fácil procedimento experimental, além de imobilizar o luminóforo e ser compatível com diferentes sais de átomos pesados. No entanto, este substrato apresenta dois problemas críticos: um alto sinal de fundo e uma baixa afinidade a elevada umidade, o que são características desfavoráveis para a fosforimetria em substrato sólido. Assim, como material alternativo, o nylon é um novo substrato promissor na área da SSRTP⁵⁹.

O termo nylon é o nome genérico utilizado para descrever um polímero sintético de cadeia longa com uma estrutura química semelhante à de uma proteína. O nylon foi a primeira de todas as fibras sintéticas, feita a partir do petróleo, gás natural, ar e água. Esse material foi desenvolvido em 1937 pelo professor norte-americano W.H. Carothers. Em 1931, Carothers descobriu uma fibra mais fina e resistente do que a seda, misturando ácido adípico ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$) e hexametilenodiamina ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$), dando origem ao nylon 6,6 ou nylon 66, como também é conhecido⁶⁰.

O uso do nylon como substrato sólido apresenta grandes vantagens, visto que possui boa seletividade, é de fácil manuseio, o sinal de fundo é baixo, e não necessita de pré-tratamento e longo tempo de secagem^{59,61}.

1.5.2. Parâmetros que afetam a intensidade da fosforescência

Vários fatores experimentais afetam a fosforescência das substâncias quando imobilizadas em substratos sólidos. A seguir serão apresentados e discutidos os aspectos experimentais mais importantes e que foram avaliados na otimização do método baseado na SSRTP que é proposto nesta dissertação. Esses fatores quando ajustados adequadamente promovem a indução e/ou permitem um grande aumento do sinal fosforescente dos analitos.

1.5.2.1. Influência do oxigênio e da umidade

As intensidades do sinal fosforescente de compostos adsorvidos em substrato sólido são diretamente afetadas com a presença do oxigênio e da umidade. Então, a fim de garantir a alta intensidade da fosforescência, se faz necessário eliminá-los ou pelo menos minimizá-los^{49,62}.

Estudos mostram que a interação do oxigênio com moléculas no estado tripleto provoca a desativação não-radiativa da molécula para o estado fundamental ($T_1 \rightarrow S_0$), acompanhada pela transição do oxigênio de seu estado tripleto natural para um estado excitado singleto⁶².

A equação de Stern-Volmer⁴⁹ demonstra a influência do oxigênio no processo de desativação sem emissão de radiação. A diminuição de fosforescência está diretamente relacionada com a concentração da espécie supressora de sinal, que neste caso é o oxigênio.

$$\frac{I}{I_q} = 1 + K_q \tau [Q] \quad \text{Equação 1}$$

onde:

I - intensidade da luminescência na ausência do agente supressor de sinal

I_q - intensidade da luminescência na presença do supressor do sinal (Q)

K_q - constante de velocidade do processo de desativação não radiativa do estado excitado

$[Q]$ - concentração da espécie supressora de sinal.

As moléculas de solvente, principalmente a água, transportam as moléculas de O_2 para o interior do substrato, propiciando assim a interação com o analito. A presença de umidade no substrato proporciona um aumento dos choques colisionais, os quais desativam as moléculas excitadas e/ou rompem as pontes de hidrogênio que se formam entre o substrato sólido e o analito. Portanto se faz necessária a adoção de procedimentos experimentais de secagem do substrato sólido que incluem a utilização de um fluxo de gás inerte e seco sobre o substrato durante a medição de sinal fosforescente e a prévia secagem do solvente no substrato por meio de um dessecador à vácuo^{46,48}. O detalhamento desse procedimento será abordado no Capítulo 2.

1.5.2.2. Efeito do átomo pesado

O sal de átomo pesado pode produzir um aumento significativo na fosforescência, decorrente do acoplamento spin-orbital⁶³. Esse efeito é denominado efeito externo do átomo pesado. Assim, a probabilidade do cruzamento intersistemas (CIS) é aumentada, transferindo a população excitada do estado singleto para o estado excitado tripleto (S_1-T_1), elevando a velocidade de desativação radiativa tripleto-singleto. Essa melhoria aumenta a probabilidade da fosforescência ocorrer⁶⁴, diminuindo, por conseguinte a probabilidade de desativação de estado excitado por fluorescência ou processos não-radiativos. Os átomos pesados tradicionalmente usados para o desenvolvimento de métodos SSRTP são tálio, iodo, prata, chumbo, mercúrio e cádmio, porém é inviável prever qual desses átomos irá favorecer a fosforescência de um determinado analito, por isso existe a necessidade de se realizar um estudo preliminar para cada um⁶⁵.

1.5.2.3. Efeito do surfactante como modificador de superfície

Os surfactantes são moléculas que possuem caráter apolar e polar simultaneamente. Eles podem ser de natureza, aniônica, catiônica ou não-iônica dependendo da estrutura da molécula do surfactante.

O uso de surfactantes associados aos substratos sólidos tem sido proposto para a SSRTP⁶⁶. Modificador de superfície, como o dodecil sulfato de sódio (SDS) vem sendo utilizado. A adição do SDS previamente à adição do átomo pesado e da solução do analito no substrato sólido pode produzir um grande aumento de fosforescência, pois a longa cadeia alquil do ânion do surfactante pode proteger o analito contra fotodecomposição causada pela fonte de irradiação durante as medições espectrais⁶⁷. Além disso, o uso do surfactante na superfície do papel pode organizar as moléculas do analito aumentando assim a quantidade de sítios ativos e a rigidez da molécula, aproximando-as mais dos sais de átomo pesado. Esse maior contato entre o analito e os sais do átomo pesado aumenta a probabilidade de acoplamento spin-orbital⁶⁸. O surfactante também evita que as moléculas do analito e do átomo pesado penetrem muito fundo na matriz celulose, facilitando a exposição destas à radiação de excitação. Entretanto, se a quantidade de SDS for excessiva, o sinal tende a cair por causa da formação de um filtro absorvente da radiação de excitação. Esse efeito de filtro vem sendo mostrado experimentalmente em vários trabalhos^{69,70}.

1.5.2.4. Influência do sistema de solventes

Estudos têm mostrado a importância da escolha do sistema de solventes na intensidade da fosforescência observada no substrato. Para a escolha do sistema de solventes devem ser consideradas a solubilidade do analito no meio e a compatibilidade química entre o solvente e o substrato utilizado. A incompatibilidade química pode afetar na repetitividade e na reprodução do processo de adsorção do luminóforo no substrato, conseqüentemente afetando a precisão das análises quantitativas⁷¹. No caso da SSRTP, usando substrato de celulose, estudos feitos por McALEese e Dunlap⁷² mostraram que existe certa relação entre a polaridade do solvente e a intensidade da fosforescência emitida pelo analito. Os autores observaram que os sinais emitidos pelo ácido 4-bifenilcarboxílico e pela aminobenzamida variavam consideravelmente em função dos solventes previamente depositados nos substratos. Os solventes

testados foram benzeno, acetona, metanol e água. Para os dois compostos, os maiores sinais fosforescentes foram observados com solventes polares (metanol e água). Os resultados obtidos foram atribuídos à maior capacidade dos solventes polares de abrir interstícios na superfície do papel para a penetração do analito e promover, conseqüentemente, uma maior rigidez da molécula.

Desta forma, a escolha do solvente para depositar o analito no substrato sólido é de muita importância para a obtenção de um bom sinal fosforescente. A solubilidade do analito é logicamente um aspecto fundamental que também deve ser considerado⁴⁶.

1.5.2.5. Influência do pH

O controle da acidez ou basicidade da solução carreadora de analito é um fator importante para um aumento da fosforescência. Espécies com cargas têm probabilidade maior de fosforescer, visto que as espécies ionizadas possuem maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel, sendo assim melhor imobilizada no substrato sólido⁴⁷. O efeito da concentração hidrogeniônica do meio carreador pode exercer grande influência, sendo largamente dependente da classe de moléculas analisadas, e sendo de extrema importância para melhorar a sensibilidade da técnica SS RTP⁴⁶.

1.5.3. Técnica para o aumento da seletividade

Apesar de o fenômeno fosforescente ser por natureza bastante seletivo o uso de recursos instrumentais pode melhorar a seletividade das determinações analíticas por SS RTP, a ponto de permitir a discriminação e determinação seletiva de substâncias com estruturas muito semelhantes sem a necessidade de separação prévia. Dos muitos recursos disponíveis, neste trabalho utilizou-se o tratamento do espectro usando a derivada de 2ª ordem.

A técnica da derivada de 2ª ordem pode ser usada na busca da seletividade das determinações analíticas de modo a separar espacialmente os sinais luminescentes de dois analitos cujas bandas não são coincidentes, mas se sobrepõem significativamente. Por exemplo, no modo d^2 , é produzido um sinal proporcional à 2ª derivada relativa ao comprimento de onda. Em geral, sinais d^2 podem ser obtidos por diferentes métodos, incluindo diferenciação eletrônica⁴⁸. Espectrofluorímetros modernos podem transformar diretamente o sinal fosforescente para a sua derivada de ordem superior usando um diferenciador

eletrônico. A derivada de um sinal I relacionado a um comprimento de onda pode ser expressa da seguinte forma:

$$dI/d\lambda = (dI/dt).(dt/d\lambda) \quad \text{Equação 2}$$

Considerando a velocidade do tratamento do comprimento de onda como $r = d\lambda/dt$, tem-se:

$$dI/d\lambda = (1/r).(dI/dt) \quad \text{Equação 3}$$

Logo, se o monocromador é varrido em uma velocidade constante, o sinal obtido pela derivação no tempo é proporcional ao espectro derivativo relativo ao comprimento de onda⁴⁸.

Uma vez medida a taxa de mudança da curvatura do pico no modo d^2 , a intensidade do sinal é amplificada, a largura das bandas é reduzida e os pequenos detalhes espectrais são amplificados pela transformação das bandas em pulsos diferenciais. Nesse caso, o pico de emissão máxima da banda original passa a ser correspondente ao ponto que cruza o eixo da ordenada do tratamento. Este efeito traz vantagens do ponto de vista da resolução dos espectros, potencializando a capacidade seletiva da espectrometria de luminescência, ou seja, da SS RTP e da fluorimetria⁴⁸.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo geral

Neste trabalho, a fosforimetria em temperatura ambiente e em substrato sólido (SSRTP) é proposta como técnica analítica para a determinação do princípio ativo do anticâncer injetável de cloridrato de irinotecana e traços do contaminante camptotecina em formulações farmacêuticas anticâncer.

1.6.2. Objetivos específicos

Este trabalho tem como objetivos específicos:

- Desenvolvimento do método, por meio de estudos preliminares das características fosforescentes da irinotecana, da camptotecina e da topotecana em substrato sólido utilizando vários sais de átomos pesados como indutores da fosforescência, usando quando necessário o modificador de superfície (SDS).
- Otimização, por estudos univariados ou por estudo multivariado (planejamento fatorial), dos fatores que influenciam na fosforescência da irinotecana e da camptotecina.
- Validação do método, por meio da obtenção dos parâmetros analíticos de mérito com posterior comparação dos resultados com àqueles obtidos em um método de referência (HPLC-DF).
- Estudos do efeito de potenciais interferentes.
- Estimativa das incertezas do método proposto.
- Avaliação da aplicabilidade do método.